



1/9/1  
DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

012673994  
WPI Acc No: 1999-480101 /199941  
XRAM Acc No: C99-141437

**New adenoviral vector useful for gene therapy**  
Patent Assignee: CENTEON PHARMA GMBH (CENT-N)  
Inventor: HAACK A; SCHMITT C  
Number of Countries: 029 Number of Patents: 007  
Patent Family:

| Patent No   | Kind | Date     | Applicat No | Kind | Date     | Week     |
|-------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| DE 19807265 | A1   | 19990826 | DE 1007265  | A    | 19980220 | 199941 B |
| AU 9917378  | A    | 19990902 | AU 9917378  | A    | 19990218 | 199948   |
| EP 950713   | A2   | 19991020 | EP 99102056 | A    | 19990202 | 199948   |
| JP 11285394 | A    | 19991019 | JP 9941549  | A    | 19990219 | 200001   |
| CA 2261183  | A1   | 19990820 | CA 2261183  | A    | 19990219 | 200005   |
| DE 19807265 | C2   | 20000105 | DE 1007265  | A    | 19980220 | 200006   |
| KR 99072793 | A    | 19990927 | KR 995666   | A    | 19990220 | 200048   |

Priority Applications (No Type Date): DE 1007265 A 19980220

Patent Details:

| Patent No                                                               | Kind | Lan | Pg | Main IPC    | Filing Notes |
|-------------------------------------------------------------------------|------|-----|----|-------------|--------------|
| DE 19807265                                                             | A1   |     | 7  | C12N-015/86 |              |
| AU 9917378                                                              | A    |     |    | C12N-015/86 |              |
| EP 950713                                                               | A2 G |     |    | C12N-015/86 |              |
| Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT |      |     |    |             |              |
| LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI                                        |      |     |    |             |              |
| JP 11285394                                                             | A    |     | 8  | C12N-015/09 |              |
| CA 2261183                                                              | A1 E |     |    | C12N-015/86 |              |
| DE 19807265                                                             | C2   |     |    | C12N-015/86 |              |
| KR 99072793                                                             | A    |     |    | C12N-015/86 |              |

Abstract (Basic): DE-19807265. A1

NOVELTY - An adenoviral (Ad) transfer vector (A) for gene transport of a DNA sequence is new and is produced from an Ad plasmid that no longer expresses a native Ad protein.

DETAILED DESCRIPTION - An adenoviral (Ad) transfer vector (A) for gene transport of a DNA sequence is produced from an Ad plasmid that no longer expresses a native Ad protein and:

(1) includes a first DNA sequence having the left inverted terminal repeat (ITR) and a packaging signal of wild-type Ad (serotype 5);

(2) includes a second Ad sequence containing the right ITR;

(3) includes cleavage sites for restriction enzymes that are not present in the marker and/or therapeutic genes inserted between the Ad sequences, and

(4) the ITRs are flanked by cleavage sites for FseI so that excision of the Ad part of the transfer vector is possible.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) cDNA (I) encoding a B-domain truncated factor VIII (II) containing amino acids 1-852 and 1524-2332 of human factor VIII;

(2) (II); and

(3) a composition containing (A) plus an agent (B) with anti-CD4 activity.

ACTIVITY - Antihemophilia.

MECHANISM OF ACTION - Protein replacement by gene therapy.

USE - (A) are used in somatic gene therapy, specifically for expressing a biologically active, truncated form of factor VIII in the liver, for treatment of hemophilia.

ADVANTAGE - (A) can accommodate up to 35 kD of inserted DNA, i.e. (truncated) cDNA for factor VIII as well as immunomodulators and/or DNA-stabilizing genes, and is ideal for expression of factor VIII in the liver. The new truncated factor VIII has the same activity as native protein but is expressed at higher levels and is more stable against proteolysis. A transient treatment of the patient with anti-CD4 agent stabilizes expression of factor VIII at a high level for a long period.

pp; 7 DwgNo 0/2

Technology Focus:

TECHNOLOGY FOCUS - BIOTECHNOLOGY - Preferred vector: Components (a) and (b) are, respectively, at least amino acids 1-358 and 35833-35935 of the wild-type Ad5 genome. The vector may also include ClaI and/or AscI sites to allow repeated insertion, one after the other, of same or different cDNA sequences at the same cleavage site. Especially the vector contains an expression cassette containing the sequence for complete or truncated factor VIII, optionally also immunomodulating and/or DNA-stabilizing genes. Also marker genes may be inserted, flanked by restriction sites that allow their subsequent removal.

Preparation: Recombinant adenovirus is produced by simultaneous transfection of a suitable cell line, e.g. human embryonic kidney 293 cells, with a helper virus or plasmid and (A). To produce the truncated factor VIII sequence, the complete sequence is cloned into pBluescriptII KS, using the SalI sites, then the product digested with EcoNI to eliminate the sequence encoding amino acids 853-1523, and non-complementary ends joined via a linker (sequence reproduced). The truncated DNA may then be cloned into pCIneo (using the SalI sites) for expression in e.g. Chinese hamster ovary cells.

PHARMACEUTICALS - In the combined preparation, (B) effects receptor blockade or T-cell depletion. Most preferably it is a monoclonal, particularly humanized, antibody against CD4.

Title Terms: NEW; VECTOR; USEFUL; GENE; THERAPEUTIC

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09; C12N-015/86

International Patent Class (Additional): A61K-031/00; A61K-031/70; A61K-048/00; C12N-005/10

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-E02B; B04-E08; B04-F11; B04-H19; B04-H20; B14-F08; D05-H11A; D05-H12A; D05-H12E; D05-H12F; D05-H17A2

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M710 M905 N133 N135 N136 P815 Q233 RA00NS-T RA00NS-N

\*02\* M423 M710 M905 N133 N135 N136 P815 Q233 RA00GT-T RA00GT-N

Specific Compound Numbers: RA00NS-T; RA00NS-N; RA00GT-T; RA00GT-N

Key Word Indexing Terms:

\*01\* 200757-0-0-0-CL, NEW 93605-0-0-0-CL, NEW



28107

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 198 07 265 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 12 N 15/86**  
A 61 K 48/00

②1 Aktenzeichen: 198 07 265.1  
②2 Anmeldetag: 20. 2. 98  
④3 Offenlegungstag: 26. 8. 99

DE 198 07 265 A 1

⑦1 Anmelder:  
Centeon Pharma GmbH, 35037 Marburg, DE  
  
⑦4 Vertreter:  
Keil & Schaafhausen Patentanwälte, 60322  
Frankfurt

⑦2 Erfinder:  
Haack, Anja, Dr., 53501 Grafschaft, DE; Schmitt,  
Christoph, 53501 Grafschaft, DE

⑥6 Entgegenhaltungen:  
DE 1 96 20 687 A1  
WO 97 32 481 A1  
WO 96 40 955 A1  
Fisher, K.J. et al., Virology 217, 1996, 11-22;  
Alemany, R. et al., J. Virol. Methods 68, 1997, 147-59;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Adenoviraler Transfervektor für den Gentransport einer DNA-Sequenz

⑤7 Es wird eine verkürzte DNA-Sequenz beschrieben, die für ein Polypeptid mit Faktor VIII-Aktivität kodiert, das aus den Aminosäuren 1 bis 852 und 1524 bis 2332 des humanen Faktors VIII besteht. Es wird außerdem ein adenoviraler Transfervektor für den Gentransport einer DNA-Sequenz beschrieben, der aus einem adenoviralen Plasmid hergestellt ist, das keine natürlichen adenoviralen Proteine mehr exprimiert und  
a) eine erste DNA-Sequenz mit der linken terminalen invertierten Sequenzwiederholung (ITR) und einem Verpackungssignal des Wildtyps Adenovirus (Serotyp 5),  
b) eine zweite DNA-Sequenz mit der rechten terminalen invertierten Sequenzwiederholung (ITR) des Wildtyps Adenovirus (Serotyp 5) sowie  
c) Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthält, die in den zwischen den adenoviralen DNA-Sequenzen einzubauenden Markergenen und/oder therapeutischen Genen nicht vorkommen und  
d) die ITRs von Schnittstellen der Restriktionsendonuklease FseI eingeschlossen sind, wodurch ein Ausschneiden des adenoviralen Anteiles des Transfervektors möglich ist.

DE 198 07 265 A 1

## Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist eine B-Domänen-verkürzte Faktor VIII-cDNA, die für ein biologisch aktives, rekombinantes, humanes Faktor VIII-Derivat kodiert, ein für den Gentransport geeigneter Transfervektor sowie ein den Transfervektor enthaltendes Kombinationspräparat, das zur Behandlung der klassischen Hämophilie A eingesetzt werden kann.

Es ist bekannt, daß die Hämophilie A durch einen chromosomalen Defekt hervorgerufen wird, der einen Mangel des zur Blutkoagulation benötigten Faktor VIII zur Folge hat. Der genetische Defekt ist im X-Chromosom lokalisiert und wird durch das weibliche Erbgut übertragen, wobei die Überträgerinnen selbst nicht hämophil sind. Eine erfolgversprechende Behandlung der Hämophilie A ist erst möglich geworden, als Plasmakonzentrate des Faktor VIII zur Verfügung gestellt werden konnten. Bei Faktorenkonzentraten aus humanem Spender-Poolplasma besteht im Prinzip die Möglichkeit, daß bisher nicht bekannte oder nicht sicher identifizierbare infektiöse Agenzien mitübertragen werden, obwohl zwar zwischenzeitlich eingeführte Inaktivierungsverfahren sowie die einzelnen Reinigungsschritte selbst solche Agenzien inaktivieren bzw. entfernen. Die Verwendung von in eukaryotischen Zellen hergestellten rekombinanten humanen Gerinnungsfaktoren reduziert ein etwaiges Risiko ganz erheblich. Nachteilig ist jedoch, daß die Expression des Wildtyp Faktor VIII bisher nur in vergleichsweise geringen Mengen gelingt. Das wird zum Einen damit erklärt, daß das Faktor VIII Molekül ein ungewöhnlich großes Polypeptid mit 2332 Aminosäuren ist, und in den bisher dafür eingesetzten Expressionssystemen die mRNA-Konzentrationen relativ niedrig sind. Des weiteren verläuft der Transport des primären Translationsproduktes vom endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat offensichtlich nicht sehr effizient, was sich aufgrund der niedrigen Sekretionsraten in geringen Ausbeuten im Zellkulturüberstand niederschlägt.

Es hat deshalb bereits Untersuchungen mit dem Ziel gegeben, die cDNA des Faktor VIII zu verkürzen. In den Internationalen Patentanmeldungen WO 86/06101, WO 87/07144 und WO 91/09122 wird bereits über die rekombinante Herstellung von verkürzten Faktor VIII-Derivaten berichtet, die die gleiche biologische Wirkung wie das Wildtyp Faktor VIII-Protein aufweisen, in animalen Zellkulturen aber in erheblich höheren Mengen exprimiert werden.

So haben beispielsweise J.J. Toole et al. über die Herstellung und Expression von Faktor VIII-Derivaten berichtet, denen die Aminosäuren 982 bis 1562 oder die Aminosäuren 760 bis 1639 fehlen (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83, 5939-5942). D.L. Eaton et al. berichteten über die Herstellung und Expression eines Faktor VIII-Derivats, dem die Aminosäuren 797 bis 1562 fehlen (Biochemistry (1986) 25, 8343 bis 8347). R.J. Kaufman beschrieb die Expression eines Faktor VIII-Derivats, dem die Aminosäuren 741 bis 1646 fehlen (Internationale Patentanmeldung WO 87/04187). N. Sarver et al. berichteten über die Herstellung und Expression eines Faktor VIII-Derivats, dem die Aminosäuren 747 bis 1560 fehlen (DNA (1987) 6, 553 bis 564). M. Pasck berichtete über die Herstellung und Expression von Faktor VIII-Derivaten, denen die Aminosäuren 745 bis 1562 oder die Aminosäuren 741 bis 1648 fehlen (Internationale Patentanmeldung WO 88100831). K.-D. Langner berichtete über die Herstellung und Expression von Faktor VIII-Derivaten, denen die Aminosäuren 816 bis 1598 oder die Aminosäuren 741 bis 1689 fehlen (Behring Inst. Mitt., (1988) No. 82, 16 bis 25, Europäische Patentanmeldung 0 295 597). P. Meulien et al. berichteten über die Herstellung und Expression von Faktor VIII-Derivaten, denen die Ami-

nosäuren 868 bis 1562 oder die Aminosäuren 771 bis 1666 fehlten (Protein Engineering (1988), 2 (4), 301 bis 306, Europäische Patentanmeldung 0 303 540). Bei der Expression dieser verkürzten Faktor VIII-Derivate in Säugetierzelllinien wurde in der Regel eine zehnmal höhere Faktor VIII Expression beobachtet verglichen mit der Herstellung des Wildtyp Faktor VIII.

Bei der Expression von verkürzten Faktor VIII-Derivaten hat sich immer wieder gezeigt, daß die hochglykosylierte B-Domäne des Faktor VIII-Moleküls zwischen den Aminosäuren Arg-739 und Glu-1649 für die prokoagulatorische und Cofaktor-Aktivität nicht erforderlich ist. Diese Erkenntnis hat Veranlassung gegeben, nach weiteren verkürzten Faktor VIII-Derivaten zu suchen, die sich in hohen Ausbeuten exprimieren lassen, die volle biologische Wirkung des Faktor VIII zeigen und sich darüber hinaus in geeignete Vektoren einbauen lassen, die eine somatische Gentherapie der Hämophilie A ermöglichen. Die somatische Gentherapie erscheint derzeit als die einzige Behandlungsmethode der Hämophilie A, mit der auf die ständige Gabe von exogen zugeführtem Faktor VIII, der im Organismus des Empfängers nur während einer kurzen Halbwertszeit wirksam bleibt, verzichtet werden kann. Dagegen würde es die somatische Gentherapie ermöglichen, daß durch die einmalige Applikation oder durch wiederholte Applikationen in größeren Zeitabständen (mehrere Wochen bis Jahre) dauerhaft eine ausreichende Bildung von Faktor VIII gesichert wird.

Verschiedene Gentransfersysteme sind in den letzten Jahren entwickelt worden, mit denen sich viele Hoffnungen auf ihre Anwendung zum Zwecke der somatischen Gentherapie verbinden. Eines der vielversprechendsten Systeme sind die sog. replikationsdefekten, adenoviralen Vektoren, die nicht nur ex vivo, sondern auch in vivo im intakten Gesamtorganismus eine sehr hohe Gentransfereffizienz gewährleisten, wie sie mit keinem anderen derzeit verfügbaren System erreicht werden kann. Ein solches Vektorsystem ist in der Europäischen Patentanmeldung 0 808 905 bereits beschrieben.

In dieses spezielle Vektorsystem kann allerdings weder die Wildtyp Faktor VIII-cDNA noch eine verkürzte Faktor VIII-cDNA, die für ein biologisch aktives Faktor VIII-Derivat kodiert, eingebaut werden, da sie zu groß sind.

Aus der internationale Patentanmeldung WO 96/33280 ist jedoch schon ein adenovirales Helfervirussystem bekannt, das bis zu 36 kB einer heterologen DNA in einen nicht mehr replikationsfähigen adenoviralen Vektor aufnehmen kann. Dieses System besteht aus einem adenoviralen Vektorkonstrukt, einem oder mehreren Helferviren und einer Helferezelllinie. Das Vektorkonstrukt kann vervielfältigt und ein Virionpartikel in der Helferezelllinie verpackt werden, wenn es zusammen mit einem Helfervirus verabreicht wird, das ein defektes Verpackungssignal enthält. Es stellte sich deshalb die Aufgabe, ein derartiges adenovirales Transfersystem so zu modifizieren und zu verbessern, daß es in der somatischen Gentherapie zum Transfer der erfindungsgemäßen B-Domänen verkürzten Faktor VIII cDNA oder für andere therapeutisch einsetzbare Gene verwendet werden kann.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch ein adenoviraler Transfervektor für den Gentransport einer DNA-Sequenz, der aus einem adenoviralen Plasmid hergestellt ist, das keine natürlichen adenoviralen Proteine mehr exprimiert und

a) eine erste DNA-Sequenz mit der linken terminalen invertierten Sequenzwiederholung (ITR) und einem Verpackungssignal des Wildtyp Adenovirus (Serotyp 5) und

b) eine zweite DNA-Sequenz mit der rechten terminalen invertierten Sequenzwiederholung (ITR) des Wild-

typ Adenovirus (Serotyp 5) sowie

c) Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthält, die in den zwischen den adenoviralen DNA-Sequenzen einzubauenden Markergenen und/oder therapeutischen Genen nicht vorkommen, wobei

d) die ITRs von Schnittstellen der Restriktionsendonuklease FseI eingeschlossen sind, wodurch ein Ausschneiden des adenoviralen Anteils des Transfervektors möglich ist.

Das in Fig. 1 dargestellt Plasmid pAd5min ist ein Beispiel für einen derartigen adenoviralen Transfervektor. Dargestellt sind die Sequenzen des Plasmids pUC19, an die über die Schnittstelle FseI zunächst die linke terminale invertierte Sequenzwiederholung und ein Verpackungssignal (ITR und Verpackungssignal= Ads-LE) mit den Basenpaaren 1 bis mindestens 358 des Wildtyp Adenovirus (Serotyp 5) angefügt ist. Dann folgen die Schnittstellen PacI, AscI und ClaI, die mit der DNA-Sequenz der rechten terminalen invertierten Sequenzwiederholung (ITR = Ad5-RE) bestehend aus den Basenpaaren 35.705 bis 35.935 verbunden ist. Anschließend ist erneut eine FseI-Schnittstelle eingefügt. Dieses Plasmid-Konstrukt erlaubt das Ausschneiden des Ads-Anteil mittels des Enzyms FseI. Die entstandene lineare DNA enthält die gleichen Enden wie der lineare Adenovirus-Wildtyp, verlängert auf jeder Seite um eine Base Cytosin.

Dieser Vektor wurde so konstruiert, daß der Einbau von Markergenen zum Beispiel für das Green Fluorescent Protein (GFP) oder von therapeutischen Genen wie denen für Faktor VIII oder Faktor IX oder zum Beispiel immunmodulierenden Adenovirus-Genen der E3-Region leicht möglich ist. Die Restriktionsendonukleasen PacI, AscI und FseI besitzen individuelle Schnittstellen, die jeweils 8 bp lang sind und daher nur sehr selten schneiden. Die Schnittwahrscheinlichkeit beträgt 1 : 4<sup>8</sup>, d. h. sie schneiden durchschnittlich nur alle 65.000 bp einmal. Damit erlauben die PacI- und AscI-Schnittstellen das Einfügen unterschiedlichster Gene, da diese nicht von den Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. ClaI schneidet zwar häufiger, zeichnet sich aber dadurch aus, daß es im Adenovirus nur einmal schneidet. PacI hat den Vorteil, daß es zur Klonierung des Markergens GFP gut geeignet ist, während AscI und ClaI das wiederholte Aneinanderreihen verschiedener Gene über die gleichen Schnittstellen ermöglichen. Die AscI-Schnittstelle erlaubt die Klonierung eines DNA-Fragments an diese Schnittstelle, wenn das DNA-Fragment in der 5'-Position eine MluI und in der 3'-Position eine AscI-Schnittstelle besitzt, wobei wiederum eine AscI-Schnittstelle entsteht. Ähnlich kann an die ClaI-Schnittstelle kloniert werden. Das seltene Vorkommen von FseI-Schnittstellen in der DNA ermöglicht das Ausschneiden des Adenovirus-Anteils zusammen mit den eingefügten Genen aus dem Gesamtplasmid.

In einen derartigen adenoviralen Transfervektor können zwischen die beiden adenoviralen Enden Expressionskassetten mit bis zu etwa 35 kb DNA insertiert werden. Damit kann die komplette oder auch eine erfindungsgemäß verkürzte cDNA-Sequenz des Faktor VIII und ggf. weitere Expressionskassetten mit immunmodulierenden und/oder DNA-stabilisierenden Genen in das Viruskonstrukt eingebaut werden.

In Fig. 2 ist ein Beispiel für einen erfindungsgemäßen Transfervektor gezeigt, in dem an die PacI-Schnittstelle eine Expressionskassette eingefügt ist, die aus dem Cytomegalovirus (CMV)-Promotor dem GFP und der Bovine Growth Hormone (BGH)-polyA-DNA besteht. Aus diesem als pGAd5min bezeichneten Plasmidkonstrukt kann aufgrund des seltenen Vorkommens der PacI-Schnittstelle das GFP-

Gen zu späteren Zeitpunkten, auch noch nach der Klonierung anderer Gene herausgeschnitten werden.

Für die Herstellung von rekombinanten Viren ist eine gleichzeitige Transfektion mittels einer (HEK-293)-Zelllinie und mit einem derartigen adenoviralen Transfervektor (zum Beispiel dem pGAd5min) und einem Helfervirus oder einem Helferplasmid notwendig. Der Transfervektor pAd5min und seine Derivate exprimieren keine adenoviralen Proteine, sofern diese nicht nachträglich insertiert sind. Deshalb müssen die für die Synthese von Adenoviren notwendigen Proteine in trans zur Verfügung gestellt werden. Dafür wird vorzugsweise das Wildtyp-Virus verwendet. Nach Produktion der Viren in Zellkultur müssen sie aufgereinigt und über einen Cäsiumchlorid-Gradienten getrennt werden.

Besonders geeignet ist der vorstehend genannte leere Transfervektor für den Einbau der erfindungsgemäßen cDNA, die für ein Polypeptid mit den Aminosäuren 1 bis 852 und 1.524 bis 2.332 des humanen Faktor VIII kodiert.

Die zur Herstellung dieses Faktor VIII-Peptids erforderliche cDNA-Sequenz wurde aus der cDNA des kompletten Faktor VIII (ATCC 39812 - pSP64-VIII) durch Klonierung in pBluescript 11 KS-Phagemid (Stratagene) unter Verwendung des Restriktionsenzym Sal I gewonnen. Das dabei entstehende pKS-FVIII wurde mit dem Restriktionsenzym Eco NI (New England Biolabs) gespalten und dabei der für die Aminosäuren 853 bis 1.523 kodierende DNA-Abschnitt entfernt. Anschließend wurden die nicht komplementären DNA-Enden mit der im Beispiel 1 beschriebenen Oligonukleotid-Linker Sequenz verknüpft. Der korrekte Einbau des Linker-Fragments wurde über Sequenzierung verifiziert. Die so hergestellte cDNA für den verkürzten Faktor VIII wurde anschließend in den Expressionsplasmiden pCneo(Promega) unter Verwendung von Sal I Restriktionsstellen eingefügt. Die Expression erfolgte in Chinesische Hamster Ovary (CHO), Monkey Kidney (COS) und Human Embryonal Kidney (HEK-293)-Zelllinien.

Zum Vergleich wurden auch die cDNA des Wildtyp Faktor VIII-Gens in den gleichen Expressionssystemen eingesetzt.

Für das erfindungsgemäß verkürzte Faktor VIII-Polypeptid konnte nachgewiesen werden, daß es die gleiche biologische Aktivität aufweist wie der Wildtyp Faktor VIII. Dabei wurden unterschiedlich hohe Expressionsraten in den verschiedenen Expressionsmedien beobachtet, die allerdings in den meisten Fällen erheblich höher lagen als die Expressionsrate des Wildtyp Faktor VIII. Außerdem konnte gezeigt werden, daß das verkürzte Faktor VIII-Polypeptid eine erhöhte Stabilität aufweist und sich im Expressionsmedium anreichern läßt, was auf eine erheblich geringere Empfindlichkeit des verkürzten Faktor VIII gegenüber proteolytischem Abbau hinweist. Dies ist ein deutlicher Unterschied zu dem Wildtyp Faktor VIII, bei dem im Expressionsmedium durch proteolytischen Abbau erhebliche Verluste beobachtet werden. Die Entfernung der B-Domäne des Faktor VIII-Moleküls, deren biologische Funktion bisher nicht geklärt werden konnte, erhöht also nicht nur die Ausbeute, sondern scheint auch die Stabilität des verkürzten Faktor VIII-Derivats gegenüber Proteasen zu erhöhen.

Die vorstehend genannten Eigenschaften des verkürzten Faktor VIII-Polypeptids sind empfehlenswerte Voraussetzungen für den Einbau der kodierenden cDNA in einen erfindungsgemäßen Transfervektor, der zu somatischen Gentherapie eingesetzt werden kann. Dabei ist anzustreben, die cDNA für den modifizierten Faktor VIII in die Leber, den physiologischen Syntheseort des Faktor VIII, einzubringen. Aus der Veröffentlichung in J. Biol. Chem. 265, Seite 7318 ff (1990) ist die Expression eines funktionsfähigen Faktor

VIII in Fibroblasten der menschlichen Haut schon bekannt, wobei der Gentransfer mit einem retroviralen Vektorsystem durchgeführt wurde. Zur Einbringung des Faktor VIII-Gens in die Leber ist dieses Vektorsystem jedoch nicht geeignet. Dagegen ist der oben erwähnte adenovirale Vektor für den Gentransfer in die Leber ideal. Durch die Verwendung eines auf diese Weise modulierten Adenovirus und die Verwendung dieses Vektors zum Gentransfer unter gleichzeitiger transients Anti-CD4-Behandlung des Empfängerorganismus könnte die Expression der Faktor VIII-CDNA auf einem hohen Niveau über einen langen Zeitraum stabilisiert werden. Die Anti-CD4-Behandlung wird vorzugsweise mit geeigneten monoklonalen Antikörpern gegen CD4-Antigene durchgeführt, die sich zeitlich mit der Applikation des adenoviralen Vektors für den Gentransfer überlappt. Das wesentliche Element dieses Transfersystems ist die Kombination des E3-positiven Vektors mit der Anti-CD4-Strategie zur Verbesserung des hepatischen Gentransfers.

Geeignete monoklonale Anti-CD4-Antikörper sind solche, die die Signaltransduktion vom CD4-Rezeptor blockieren oder den Zielorganismus von CD4-positiven Lymphozyten depletieren. Besonders bevorzugt sind jeweils entsprechende humanisierte monoklonale Antikörper. Dieses adenovirale Vektorsystem ermöglicht es, die erfindungsgemäße cDNA in die Leber als Zielorgan zu transferieren und in Kombination mit transients Anti-CD4-Behandlung eine erheblich verbesserte Toleranz zu gewährleisten.

Die Erfindung wird durch die folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

#### Beispiel 1

##### Herstellung einer verkürzten cDNA für den Faktor VIII

Die aus dem Stamm ATCC 39812 – pSP64 – VIII gewonnene cDNA für den Faktor VIII wurde in pBluescript II KS-Phagemid (Stratagene) unter Verwendung der SalI Restriktionsstellen kloniert. Das dabei entstehende Plasmid PKSFVIII wurde mit Eco NI (New England Biolabs) geschnitten und die nicht komplementären Enden durch Einfügung von elf Basenpaare umfassenden Oligonukleotid-Bindestücken miteinander verbunden. Hierfür wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

SEQ ID No. 1: 5'G TCA GGC CTC C 3'  
SEQ ID No. 2: 5, AG GAG GCC TGA 3'.

Der korrekte Einbau der Verbindungsstücke wurde durch eine automatische Fluoreszenz-Sequenzanalyse nachgewiesen (Applied Biosystem 373 A). Die entstandene verkürzte cDNA (5,2 kb) kodiert für ein verkürztes Faktor VIII-Protein, in dem die Aminosäure 852 mit der Aminosäure 1524 verbunden ist.

#### Beispiel 2

##### Expressionssysteme

Die Wildtyp und die verkürzte Faktor VIII-cDNA wurden in das Expressionsplasmid pCI-neo (Promega) unter Verwendung der SalI-Restriktionsstellen kloniert. Für die Expression wurden CHO-, COS- und HEK-293-Zelllinien verwendet. Das Zellmedium bestand aus 10% fetalem Kälberserum (BioWhittaker), 1% Penicillin-Streptomycinlösung (BioWhittaker) und Hams F12 (Gibco) für CHO-Zellen oder Dulbeccos Modified Eagle Medium (Gibco) für HEK-293- und COS-Zelllinien.

Die Transfektion wurde auf sechs Mikrotiterplatten

(Nunc) bei einer Zelldichte von etwa 70% durchgeführt. In jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 15 µl Lipofectamin-Reagenz (Gibco), 1,5 µg endotoxinfreie Plasmid DNA (gereinigt mit dem Qiagen Plasmid Kit, Endo free maxi) und 1 ml serum-reduziertes Medium (OptiMEM, Gibco) gemischt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten wurde die Transfektionsmischung zu den Zellen gegeben und dann bis zu 24 Stunden inkubiert. Die Transfektion wurde dann beendet, indem die Mischung gesammelt und die Zellen sofort mit Normalmedium inkubiert wurden.

#### Beispiel 3

##### Antigenbestimmung des Faktor VIII

Die Antigenbestimmung wurde mit einem hochempfindlichen Faktor VIII-ELISA durchgeführt. Bei diesem Sandwich-ELISA wurden die Platten mit einem monoklonalen anti-human-Faktor VIII-Antikörper (ESH5, American Diagnostica) beschichtet. Der gebundene Faktor VIII wurde mit einem polyklonalen Schaf-antihuman-Faktor VIII-Antikörper (Cedarlane) und einem polyklonalen, Peroxidasegekoppelten, anti-Schaf IgG-Antikörper vom Esel (Jackson ImmunoResearch Laboratories) nachgewiesen. Gesammeltes Plasma von normalen Individuen wurde als Standard benutzt.

Die Faktor VIII-Aktivität wurde durch einen chromogenen Assay (DADE® Faktor VIII-Chromogen, Baxter) gemessen und sowohl ein einstufiger Assay basierend auf natürlichem, Faktor VIII-freiem Plasma als auch ein einstufiger Assay, basierend auf einem durch Immunadsorption Faktor VIII-freiem Plasma (Immuno) eingesetzt.

#### Beispiel 4

##### Konstruktion eines komplett deletierten adenoviralen Transfervektors

231 bp des 3'-Endes, bezogen auf den I-Strang des Wildtyp-Adenovirus (Serotyp 5) wurden durch PCR vervielfältigt, wobei die Primer Primer Ads-RE-A und Ads-RE-B mit folgenden Basensequenzen eingesetzt wurden:  
Basensequenz des Primers Ads-RE-A (=SEQ ID No. 3):

5'TTG GCG CGC CAT CGA TGC CCA GAA ACG AAA GCC AAA AAA CCC 3'

Basensequenz des Primers Ad5-RE-B (=SEQ ID No. 4):

5' CCC AAG CTT GGC CGG CCA TCA TCA ATA ATA TAC CTT ATT TTG G 3.'

Dadurch wurde an das PGR-Produkt in der 5'-Position eine AscI- und eine ClaI-Restriktionsendonukleasen-Schnittstelle und in der 3'-Position eine FseI- und eine Hind III-Schnittstelle angehängt. Über die AscI- und die Hind III-Schnittstellen konnte das PCR-Produkt in das Plasmid pNEB193 (New England Biolabs) kloniert werden. Das entstandene Plasmid wurde pUCRE genannt.

Analog wurden 436 bp des Adenovirus 5'-Endes mit den Primern Ad5-LE-A2 und Ads-LE-B2 amplifiziert.

Basensequenz des Primers Ad5-LE-A2 (=SEQ ID No. 5):

5' GGG ACG TCG GCC GGC CAT CAT CAA TAA TAT ACC TTA TTT TGG 3'

Basensequenz des Primers Ad5-LE-B2 (=SEQ ID No. 6):

5' TTG ACG TCG GCG CGC CTT AAT TAA CGC CAA  
CTT TGA CCC GGA ACG C 3'.

Mittels der angehängten Schnittstellen für die Enzyme AatII und FseI am 5'-Ende, sowie PacI und AscI am 3'-Ende konnte dieses PCR-Produkt in pUCRE über AatII und AscI kloniert werden.

Dabei entstand das in Fig. 1 dargestellte Plasmid. Dieses Plasmid-Konstrukt erlaubt das Ausschneiden des Ads-Anteils mittels des Enzyms FseI. Die entstandene lineare DNA enthält die gleichen Enden wie der lineare Adenovirus-Wildtyp, verlängert auf jeder Seite um eine Base Cytosin.

#### Beispiel 5

Einbau einer Expressionskassette in das Plasmid pAd5min

Die DNA für das Green Fluorescent Protein (GFP) wurde aus pEGFP-N1 (Clontech) über BamHI- und XbaI-Schnittstellen in pABS.4 (Microbix) kloniert. Der Promotor und das polyA-Signal wurden aus pRc/CMV (Invitrogen) über die Schnittstellen Apol/EcoRI und KpnI bzw. XbaI und XhoI/Sall in das obige Konstrukt kloniert. Das Plasmid wurde pAGFP/CB genannt. GFP samt Expressionskassette und Kanamycin-Resistenz konnten aus diesem Plasmid mittels der PacI-Schnittstellen isoliert und in pAd5min kloniert werden. Anschließend konnte die Resistenz über SmaI-Schnittstellen aus dem Plasmid entfernt werden. Dieses Plasmidkonstrukt wurde pGAd5min genannt. Aufgrund des seltenen Vorkommens der PacI-Schnittstelle kann das GFP-Gen zu späteren Zeitpunkten und nach Klonierung anderer Gene immer aus dem Plasmid herausgeschnitten werden.

#### Patentansprüche

1. B-Domänen-verkürzte Faktor VIII-cDNA, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie aus den Aminosäuren 1 bis 852 und 1524 bis 2332 des humanen Faktor VIII besteht.
2. Polypeptid mit Faktor VIII-Aktivität, **dadurch gekennzeichnet**, daß es aus den Aminosäuren 1 bis 852 und 1524 bis 2332 des humanen Faktor VIII besteht.
3. Adenoviraler Transfervektor für den Gentransport einer DNA-Sequenz, **dadurch gekennzeichnet**, daß er aus einem adenoviralen Plasmid hergestellt ist, das keine natürlichen adenoviralen Proteine mehr exprimiert und
  - a) eine erste DNA-Sequenz mit der linken terminalen invertierten Sequenzwiederholung (ITR) und einem Verpackungssignal des Wildtyp Adenovirus (Serotyp 5),
  - b) eine zweite DNA-Sequenz mit der rechten terminalen invertierten Sequenzwiederholung (ITR) des Wildtyp Adenovirus (Serotyp 5) sowie
  - c) Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthält, die in den zwischen den adenoviralen DNA-Sequenzen einzubauenden Markergenen und/oder therapeutischen Genen nicht vorkommen und
  - d) die ITRs von Schnittstellen der Restriktionsendonuklease FseI eingeschlossen sind, wodurch ein Ausschneiden des adenoviralen Anteiles des Transfervektors möglich ist.
4. Transfervektor nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die erste DNA-Sequenz die Basenpaare 1 bis mindestens 358 und die zweite DNA wenigstens die Basenpaare 35 833 bis 35 935 des Wildtyp Adenovirus (Serotyp 5) umfaßt.

5. Transfervektor nach den Ansprüchen 3 und 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß er jeweils eine Schnittstelle für die Restriktionsendonukleasen ClaI und/oder AscI enthält, wodurch das wiederholte Aneinanderreihen gleicher oder verschiedener cDNA-Sequenzen an der gleichen Schnittstelle möglich ist.

6. Transfervektor nach den Ansprüchen 3 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß er eine Expressionskassette mit der kompletten oder einer verkürzten cDNA-Sequenz des Faktor VIII gemäß Anspruch 1 und gegebenenfalls weitere Expressionskassetten mit immunmodulierenden und/oder DNA-stabilisierenden Genen enthält.

7. Transfervektor nach den Ansprüchen 3 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß er zusätzlich ein oder mehrere Markergene enthält, die zur Entfernung aus dem Vektor von geeigneten Schnittstellen umgeben sind.

8. Transfervektor nach den Ansprüchen 3 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß er mit Hilfe eines adenoviralen Helfervirus oder Helferplasmids und einer Helferzelllinie konstruiert worden ist.

9. Kombinationspräparat, **dadurch gekennzeichnet**, daß es einen adenoviralen Vektor nach den Ansprüchen 3 bis 8 und ein Mittel zur Anti-CD4-Behandlung enthält.

10. Kombinationspräparat nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Mittel zur Anti-CD4-Behandlung eine Rezeptorblockade oder eine T-Zellen-Depletion bewirkt.

11. Verwendung eines Transfervektors nach den Ansprüchen 3 bis 8 zur Herstellung eines für die somatische Gentherapie einsetzbaren Arzneimittels.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -



**Fig.1**

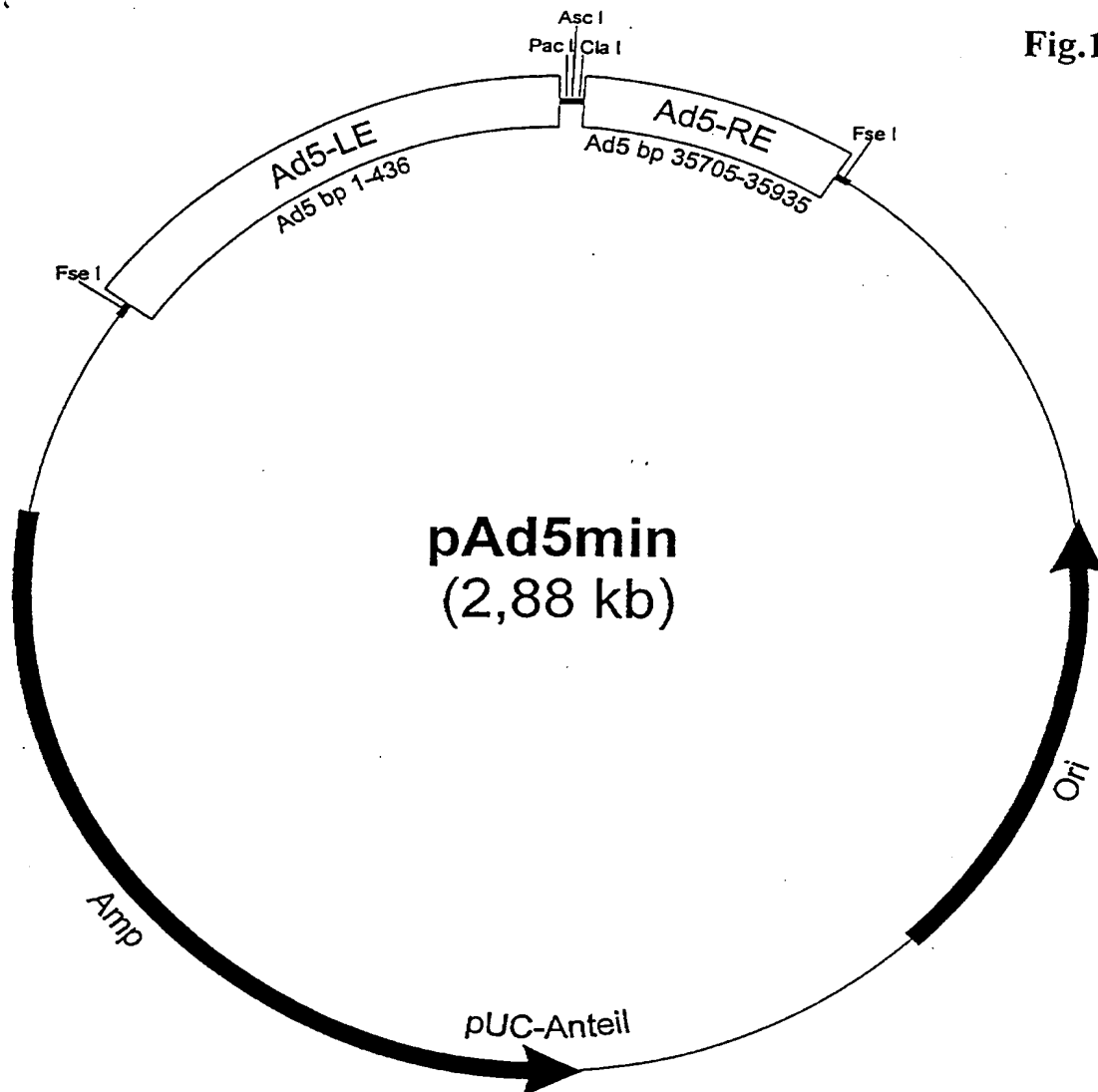
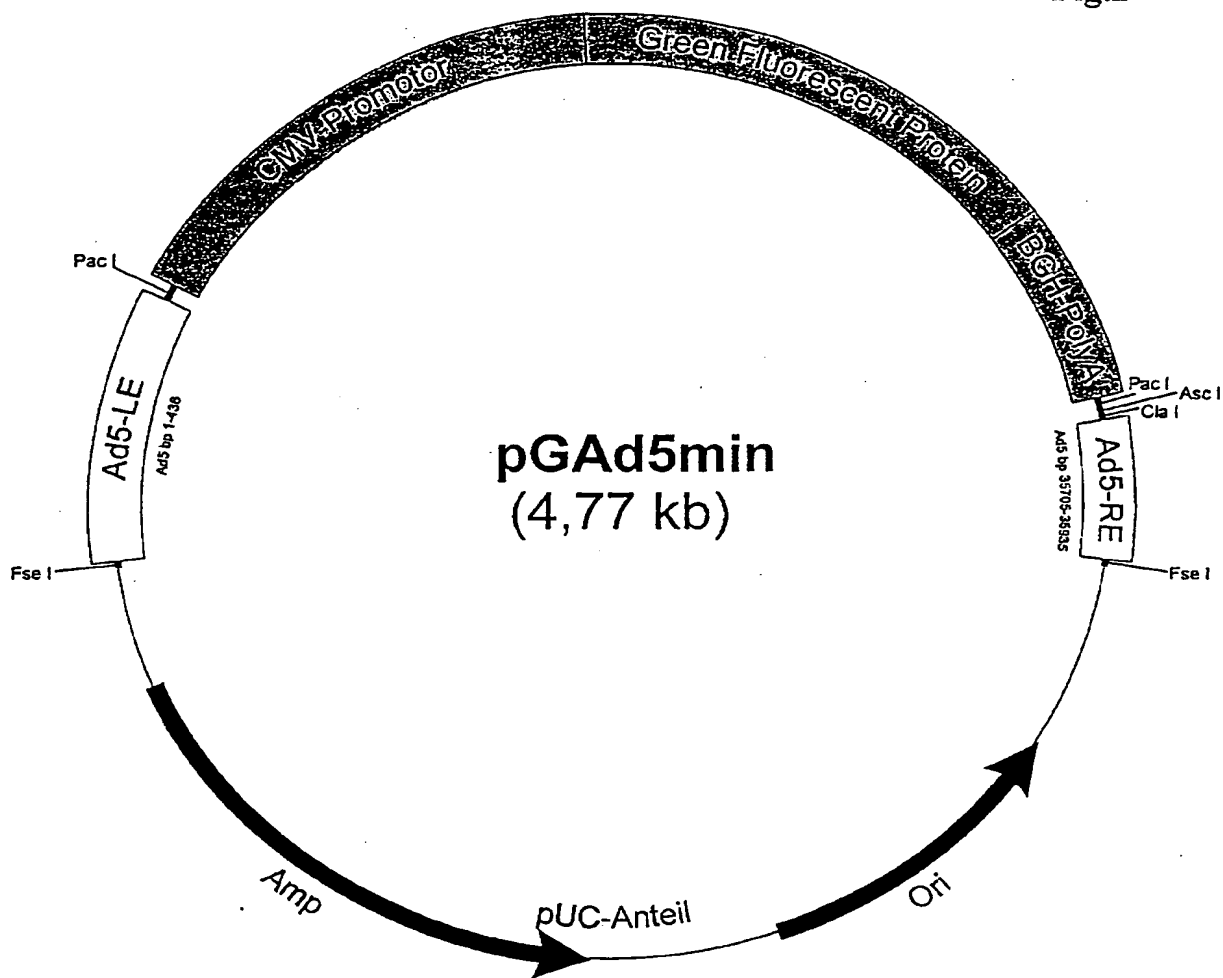


Fig.2





①⑨ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Patentschrift**  
⑩ **DE 198 07 265 C 2**

⑤① Int. Cl. 7:  
**C 12 N 15/86**  
A 61 K 48/00

②① Aktenzeichen: 198 07 265.1-41  
②② Anmeldetag: 20. 2. 1998  
④③ Offenlegungstag: 26. 8. 1999  
④⑤ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 5. 1. 2000

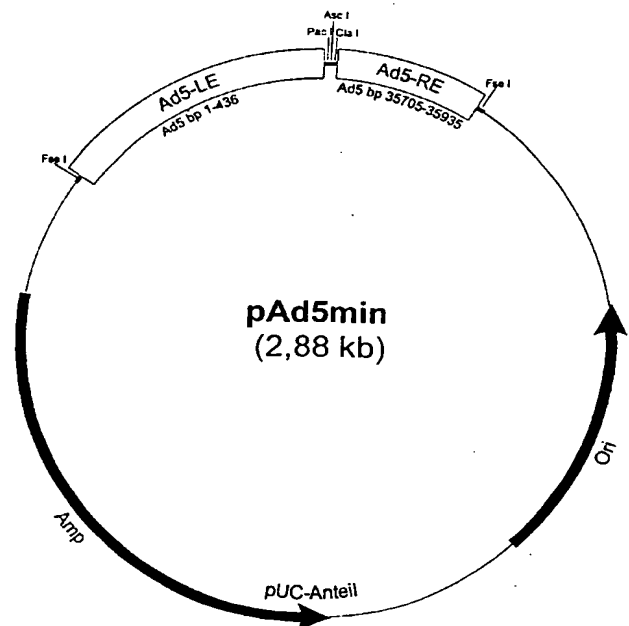
Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ **Patentinhaber:**  
Centeon Pharma GmbH, 35037 Marburg, DE  
  
⑦④ **Vertreter:**  
Keil & Schaafhausen Patentanwälte, 60322  
Frankfurt

⑦② **Erfinder:**  
Haack, Anja, Dr., 53501 Grafschaft, DE; Schmitt,  
Christoph, 53501 Grafschaft, DE  
  
⑤⑥ **Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:**  
DE 1 96 20 687 A1  
WO 97 32 481 A1  
WO 96 40 955 A1  
Fisher, K.J. et al., Virology 217, 1996, 11-22;  
Alemany, R. et al., J. Virol. Methods 68, 1997, 147-  
59;

⑤④ **Adenoviraler Transfektor für den Gentransport einer DNA-Sequenz**

⑤⑦ Adenoviraler Transfektor für den Gentransport einer  
DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, dass er aus ei-  
nem adenoviralen Plasmid hergestellt ist, das keine natür-  
lichen adenoviralen Proteine mehr exprimiert und  
a) eine erste DNA-Sequenz mit der linken terminalen in-  
vertierten Sequenzwiederholung (ITR) und einem Verpak-  
kungssignal des Wildtyp Adenovirus (Serotyp 5),  
b) eine zweite DNA-Sequenz mit der rechten terminalen  
invertierten Sequenzwiederholung (ITR) des Wildtyp Ade-  
novirus (Serotyp 5) sowie  
c) Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthält,  
die in den zwischen den adenoviralen DNA-Sequenzen  
einzubauenden Markergenen und/oder therapeutischen  
Genen nicht vorkommen und  
d) die ITRs von Schnittstellen der Restriktionsendonu-  
klease FseI eingeschlossen sind, wodurch ein Ausschnei-  
den des adenoviralen Anteiles des Transfektors mög-  
lich ist.



DE 198 07 265 C 2

DE 198 07 265 C 2

## Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist ein für den Gentransport geeigneter Transfervektor und seine Verwendung zur Herstellung eines für die somatische Gentherapie einsetzbaren Arzneimittels.

- Es ist bekannt, daß viele Erkrankungen, wie zum Beispiel die Hämophilie A, durch einen chromosomalen Defekt hervorgerufen werden, der zur Folge hat, daß ein für den Organismus wichtiges Protein nicht oder nicht in ausreichender Menge zur Verfügung steht. In derartigen Fällen hat bisher nur die Möglichkeit bestanden, dem Patienten das fehlende Protein von außen zuzuführen. Eine derartige Substitutionstherapie ist jedoch aufwendig und mit einer Reihe von Nachteilen verbunden. Deshalb wird seit einigen Jahren verstärkt nach Möglichkeiten gesucht, mittels einer somatischen Gentherapie eine verbesserte Behandlungsmethode einzuführen, mit der durch eine einmalige Applikation oder durch wiederholte Applikationen in größeren zeitabständen (mehrere Wochen bis Jahre) dauerhaft eine ausreichende Bildung des fehlenden Proteins gesichert wird.

- Verschiedene Gentransfersysteme sind in den letzten Jahren entwickelt worden, mit denen sich viele Hoffnungen auf ihre Anwendung zum Zwecke der somatischen Gentherapie verbinden. Eines der vielversprechendsten Systeme sind die sog. replikationsdefekten, adenoviralen Vektoren, die nicht nur ex vivo, sondern auch in vivo im intakten Gesamtorganismus eine sehr hohe Gentransfereffizienz gewährleisten, wie sie mit keinem anderen derzeit verfügbaren System erreicht werden kann. Ein solches Vektorsystem ist in der Europäischen Patentanmeldung 0 808 905 bereits beschrieben.

In dieses spezielle Vektorsystem kann allerdings weder die Wildtyp Faktor VIII-cDNA noch eine verkürzte Faktor VIII-cDNA, die für ein biologisch aktives Faktor VIII-Derivat kodiert, eingebaut werden, da sie zu groß sind.

- Aus der internationalen Patentanmeldung WO 96/33280 ist jedoch schon ein adenovirales Helfervirussystem bekannt, das bis zu 36 kB einer heterologen DNA in einen nicht mehr replikationsfähigen adenoviralen Vektor aufnehmen kann. Dieses System besteht aus einem adenoviralen Vektorkonstrukt, einem oder mehreren Helferviren und einer Helferzelllinie. Das Vektorkonstrukt kann vervielfältigt und ein Virionpartikel in der Helferzelllinie verpackt werden, wenn es zusammen mit einem Helfervirus verabreicht wird, das ein defektes Verpackungssignal enthält. Es stellte sich deshalb die Aufgabe, ein derartiges adenovirales Transfersystem so zu modifizieren und zu verbessern, daß es in der somatischen Gentherapie zum Transfer für therapeutisch einsetzbare Gene verwendet werden kann.

- Es sind bereits verschiedene adenovirale Vektoren bekannt aus den Veröffentlichungen von Fischer, K. J. et al., Virology 217, 1996, 11-22 und von Alemany, R. et al., J. Virol. Methods 68, 1997, 147-59 sowie aus den internationalen Patentanmeldungen WO 96/40955 und WO 97/32481. In diesen Veröffentlichungen werden zum Teil auch Vektoren beschrieben, die flankierende Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen aufweisen, wodurch ein Ausschneiden des adenoviralen Anteils des Transfervektors möglich ist. Als flankierende Restriktionsstellen werden zum Beispiel in der vorstehend genannten Veröffentlichung von Alemany Eco RI und NheI-sites genannt, die jedoch für adenovirale Transfervektoren entscheidende Nachteile haben, weil sie eine relativ kurze Erkennungssequenz aufweisen, wodurch die Gefahr einer Zerstückelung der in den Transfervektor eingefügten DNA besteht.

- Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein adenoviraler Transfervektor für den Gentransport einer DNA-Sequenz, der aus einem adenoviralen Plasmid hergestellt ist, das keine natürlichen adenoviralen Proteine mehr exprimiert und

- a) eine erste DNA-Sequenz mit der linken terminalen invertierten Sequenzwiederholung (ITR) und einem Verpackungssignal des Wildtyp Adenovirus (Serotyp 5) und
- b) eine zweite DNA-Sequenz mit der rechten terminalen invertierten Sequenzwiederholung (ITR) des Wildtyp Adenovirus (Serotyp 5) sowie
- c) Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthält, die in den zwischen den adenoviralen DNA-Sequenzen einzubauenden Markergenen und/oder therapeutischen Genen nicht vorkommen, wobei
- d) die ITRs von Schnittstellen der Restriktionsendonuklease FseI eingeschlossen sind, wodurch ein Ausschneiden des adenoviralen Anteils des Transfervektors möglich ist.

- Das in Fig. 1 dargestellte Plasmid pAd5min ist ein Beispiel für einen derartigen adenoviralen Transfervektor. Dargestellt sind die Sequenzen des Plasmids pUC19, an die über die Schnittstelle FseI zunächst die linke terminale invertierte Sequenzwiederholung und ein Verpackungssignal (ITR und Verpackungssignal = Ad5-LE) mit den Basenpaaren 1 bis mindestens 358 des Wildtyp Adenovirus (Serotyp 5) angefügt ist. Dann folgen die Schnittstellen PacI, AscI und ClaI, die mit der DNA-Sequenz der rechten terminalen invertierten Sequenzwiederholung (ITR = Ad5-RE) bestehend aus den Basenpaaren 35.705 bis 35.935 verbunden ist. Anschließend ist erneut eine FseI-Schnittstelle eingefügt. Dieses Plasmid-Konstrukt erlaubt das Ausschneiden des Ad5-Anteils mittels des Enzyms FseI. Die entstandene lineare DNA enthält die gleichen Enden wie der lineare Adenovirus-Wildtyp, verlängert auf jeder Seite um eine Base Cytosin.

- Dieser Vektor wurde so konstruiert, daß der Einbau von Markergenen zum Beispiel für das Green Fluorescent Protein (GFP) oder von therapeutischen Genen wie denen für Faktor VIII oder Faktor IX oder zum Beispiel immunmodulierenden Adenovirus-Genen der E3-Region leicht möglich ist. Die Restriktionsendonukleasen PacI, AscI und FseI besitzen individuelle Schnittstellen, die jeweils 8 bp lang sind und daher nur sehr selten schneiden. Die Schnittwahrscheinlichkeit beträgt  $1 \cdot 4^8$ , d. h. sie schneiden durchschnittlich nur alle 65.000 bp einmal. Damit erlauben die PacI- und AscI-Schnittstellen das Einfügen unterschiedlichster Gene, da diese nicht von den Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. ClaI schneidet zwar häufiger, zeichnet sich aber dadurch aus, daß es im Adenovirus nur einmal schneidet. PacI hat den Vorteil, daß es zur Klonierung des Markergens GFP gut geeignet ist, während AscI und ClaI das wiederholte Aneinanderreihen verschiedener Gene über die gleichen Schnittstellen ermöglichen. Die AscI-Schnittstelle erlaubt die Klonierung eines DNA-Fragments an diese Schnittstelle, wenn das DNA-Fragment in der 5'-Position eine MluI und in der 3'-Position eine AscI-Schnittstelle besitzt, wobei wiederum eine AscI-Schnittstelle entsteht. Ähnlich kann an die ClaI-Schnittstelle kloniert werden. Das seltene Vorkommen von FseI-Schnittstellen in der DNA ermöglicht das Ausschneiden des Adenovirus-Anteils zusammen mit den eingefügten Genen aus dem Gesamtplasmid.

In einen derartigen adenoviralen Transfervektor können zwischen die beiden adenoviralen Enden Expressionskasset-

ten mit bis zu etwa 35 kb DNA insertiert werden. Damit kann beispielsweise die komplette oder auch eine verkürzte cDNA-Sequenz des Faktor VIII und ggf. weitere Expressionskassetten mit immunmodulierenden und/oder DNA-stabilisierenden Genen in das Viruskonstrukt eingebaut werden.

In Fig. 2 ist ein Beispiel für einen erfindungsgemäßen Transfervektor gezeigt, in dem an die PacI-Schnittstelle eine Expressionskassette angefügt ist, die aus dem Cytomegalovirus (CMV)-Promotor dem GFP und der Bovine Growth Hormone (BGH)-polyA-DNA besteht. Aus diesem als pGAd5min bezeichneten Plasmidkonstrukt kann aufgrund des seltenen Vorkommens der PacI-Schnittstelle das GFP-Gen zu späteren Zeitpunkten, auch noch nach der Klonierung anderer Gene, herausgeschnitten werden.

Für die Herstellung von rekombinanten Viren ist eine gleichzeitige Transfektion mittels einer (HEK-293)-Zelllinie und mit einem derartigen adenoviralen Transfervektor (zum Beispiel dem pGAd5min) und einem Helfervirus oder einem Helferplasmid notwendig. Der Transfervektor pAd5min und seine Derivate exprimieren keine adenoviralen Proteine, sofern diese nicht nachträglich insertiert sind. Deshalb müssen die für die Synthese von Adenoviren notwendigen Proteine in trans zur Verfügung gestellt werden. Dafür wird vorzugsweise das Wildtyp-Virus verwendet. Nach Produktion der Viren in Zellkultur müssen sie aufgereinigt und über einen Cäsiumchlorid-Gradienten getrennt werden.

Der vorstehende genannte leere Transfervektor ist zum Beispiel für den Einbau einer cDNA, die für ein Polypeptid mit den Aminosäuren 1 bis 852 und 1.524 bis 2.332 des humanen Faktor VIII sehr geeignet.

Die zur Herstellung dieses Faktor VIII-Peptids erforderliche cDNA-Sequenz wurde aus der cDNA des kompletten Faktor VIII (ATCC 39812 – pSP64-VIII) durch Klonierung in pBluescript II KS-Phagemid (Stratagene) unter Verwendung des Restriktionsenzym Sal I gewonnen. Das dabei entstehende pKS-FVIII wurde mit dem Restriktionsenzym Eco NI (New England Biolabs) gespalten und dabei der für die Aminosäuren 853 bis 1.523 kodierende DNA-Abschnitt entfernt. Anschließend wurden die nicht komplementären DNA-Enden mit der im Beispiel 1 beschriebenen Oligonukleotid-Linker Sequenz verknüpft. Der korrekte Einbau des Linker-Fragments wurde über Sequenzierung verifiziert. Die so hergestellte cDNA für den verkürzten Faktor VIII wurde anschließend in den Expressionsplasmiden pCI-neo(Promega) unter Verwendung von SalI Restriktionsstellen eingefügt. Die Expression erfolgte in Chinese Hamster Ovary (CHO), Monkey Kidney (COS) und Human Embryonal Kidney (HEK-293)-Zelllinien.

Zum Vergleich wurden auch die cDNA des Wildtyp Faktor VIII-Gens in den gleichen Expressionssystemen eingesetzt.

Für das verkürzte Faktor VIII-Polypeptid konnte nachgewiesen werden, daß es die gleiche biologische Aktivität aufweist wie der Wildtyp Faktor VIII. Dabei wurden unterschiedlich hohe Expressionsraten in den verschiedenen Expressionsmedien beobachtet, die allerdings in den meisten Fällen erheblich höher lagen als die Expressionsrate des Wildtyp Faktor VIII. Außerdem konnte gezeigt werden, daß das verkürzte Faktor VIII-Polypeptid eine erhöhte Stabilität aufweist und sich im Expressionsmedium anreichern läßt, was auf eine erheblich geringere Empfindlichkeit des verkürzten Faktor VIII gegenüber proteolytischem Abbau hinweist. Dies ist ein deutlicher Unterschied zu dem Wildtyp Faktor VIII, bei dem im Expressionsmedium durch proteolytischen Abbau erhebliche Verluste beobachtet werden. Die Entfernung der B-Domäne des Faktor VIII-Moleküls, deren biologische Funktion bisher nicht geklärt werden konnte, erhöht also nicht nur die Ausbeute, sondern scheint auch die Stabilität des verkürzten Faktor VIII-Derivats gegenüber Proteasen zu erhöhen.

Die vorstehend genannten Eigenschaften des verkürzten Faktor VIII-Polypeptids sind empfehlenswerte Voraussetzungen für den Einbau einer cDNA in einen erfindungsgemäßen Transfervektor, der zu somatischen Gentherapie eingesetzt werden kann. Dabei ist anzustreben, die cDNA für den modifizierten Faktor VIII in die Leber, den physiologischen Synthesort des Faktor VIII, einzubringen. Aus der Veröffentlichung in J. Biol. Chem. 265, Seite 7318 ff(1990) ist die Expression eines funktionsfähigen Faktor VIII in Fibroblasten der menschlichen Haut schon bekannt, wobei der Gentransfer mit einem retroviralen Vektorsystem durchgeführt wurde. Zur Einbringung des Faktor VIII-Gens in die Leber ist dieses Vektorsystem jedoch nicht geeignet. Dagegen ist der oben erwähnte adenovirale Vektor für den Gentransfer in die Leber ideal. Durch die Verwendung eines auf diese Weise modulierten Adenovirus und die Verwendung dieses Vektors zum Gentransfer unter gleichzeitiger transients Anti-CD4-Behandlung des Empfängerorganismus könnte die Expression der Faktor VIII-CDNA auf einem hohen Niveau über einen langen Zeitraum stabilisiert werden. Die Anti-CD4-Behandlung wird vorzugsweise mit geeigneten monoklonalen Antikörpern gegen CD4-Antigene durchgeführt, die sich zeitlich mit der Applikation des adenoviralen Vektors für den Gentransfer überlappt. Das wesentliche Element dieses Transfersystems ist die Kombination des E3-positiven Vektors mit der Anti-CD4-Strategie zur Verbesserung des hepatischen Gentransfers.

Die Erfindung wird durch die folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert:

#### Beispiel 1 – Herstellung einer verkürzten cDNA für den Faktor VIII

Die aus dem Stamm ATCC 39812 – pSP64 – VIII gewonnene cDNA für den Faktor VIII wurde in pBluescript II KS-Phagemid (Stratagene) unter Verwendung der SalI Restriktionsstellen kloniert. Das dabei entstehende Plasmid pKS-FVIII wurde mit Eco NI (New England Biolabs) geschnitten und die nicht komplementären Enden durch Einfügung von elf Basenpaare umfassenden Oligonukleotid-Bindestücken miteinander verbunden. Hierfür wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

SEQ ID No. 1: 5' G TCA GGC CTC C 3'

SEQ ID No. 2: 5' AG GAG GCC TGA 3'

Der korrekte Einbau der Verbindungsstücke wurde durch eine automatische Fluoreszenz-Sequenzanalyse nachgewiesen (Applied Biosystem 373 A). Die entstandene verkürzte cDNA (5,2 kb) kodiert für ein verkürztes Faktor VIII-Protein, in dem die Aminosäure 852 mit der Aminosäure 1524 verbunden ist.

## Beispiel 2 – Expressionssysteme

Die Wildtyp und die verkürzte Faktor VIII-cDNA wurden in das Expressionsplasmid pCI-neo (Promega) unter Verwendung der SalI-Restriktionsstellen kloniert. Für die Expression wurden CHO-, COS- und HEK-293-Zelllinien verwendet. Das Zellmedium bestand aus 10% fetalem Kälberserum (BioWhittaker), 1% Penicillin-Streptomycinlösung (BioWhittaker) und Hams F12 (Gibco) für CHO-Zellen oder Dulbeccos Modified Eagle Medium (Gibco) für HEK-293- und COS-Zelllinien.

Die Transfektion wurde auf sechs Mikrotiterplatten (Nunc) bei einer Zelldichte von etwa 70% durchgeführt. In jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 15 µl Lipofectamin-Reagenz (Gibco), 1,5 µg endotoxinfreie Plasmid DNA (gereinigt mit dem Quiagen Plasmid Kit, Endo free maxi) und 1 ml serum-reduziertes Medium (OptiMEM, Gibco) gemischt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten wurde die Transfektionsmischung zu den Zellen gegeben und dann bis zu 24 Stunden inkubiert. Die Transfektion wurde dann beendet, indem die Mischung gesammelt und die Zellen sofort mit Normalmedium inkubiert wurden.

## Beispiel 3 – Antigenbestimmung des Faktor VIII

Die Antigenbestimmung wurde mit einem hochempfindlichen Faktor VIII-ELISA durchgeführt. Bei diesem Sandwich-ELISA wurden die Platten mit einem monoklonalen anti-human-Faktor VIII-Antikörper (ESH5, American Diagnostica) beschichtet. Der gebundene Faktor VIII wurde mit einem polyklonalen Schaf-antihuman-Faktor VIII-Antikörper (Cedarlane) und einem polyklonalen, Peroxidase-gekoppelten, anti-Schaf IgG-Antikörper vom Esel (Jackson ImmunoResearch Laboratories) nachgewiesen. Gesammeltes Plasma von normalen Individuen wurde als Standard benutzt.

Die Faktor VIII-Aktivität wurde durch einen chromogenen Assay (DADE® Faktor VIII-Chromogen, Baxter) gemessen und sowohl ein einstufiger Assay basierend auf natürlichem, Faktor VIII-freiem Plasma als auch ein einstufiger Assay, basierend auf einem durch Immunadsorption Faktor VIII-freiem Plasma (Immuno) eingesetzt.

## Beispiel 4 – Konstruktion eines komplett deletierten adenoviralen Transfervektors

231 bp des 3'-Endes, bezogen auf den 1-Strang des Wildtyp-Adenovirus (Serotyp 5) wurden durch PCR vervielfältigt, wobei die Primer Ad5-RE-A und Ad5-RE-B mit folgenden Basensequenzen eingesetzt wurden:

Basensequenz des Primers Ad5-RE-A (= SEQ ID No. 3):

5' TTG GCG CGC CAT CGA TGC CCA GAA ACG AAA GCC AAA AAA CCC 3'

Basensequenz des Primers Ad5-RE-B (= SEQ ID No. 4):

5' CCC AAG CTT GGC CGG CCA TCA TCA ATA ATA TAC CTT ATT TTG G 3'

Dadurch wurde an das PCR-Produkt in der 5'-Position eine AscI- und eine ClaI-Restriktionsendonukleasen-Schnittstelle und in der 3'-Position eine FseI- und eine Hind III-Schnittstelle angehängt. Über die AscI- und die Hind III-Schnittstellen konnte das PCR-Produkt in das Plasmid pNEB193 (New England Biolabs) kloniert werden. Das entstandene Plasmid wurde pUCRE genannt.

Analog wurden 436 bp des Adenovirus 5'-Endes mit den Primern Ad5-LE-A2 und Ad5-LE-B2 amplifiziert.

Basensequenz des Primers Ad5-LE-A2 (= SEQ ID No. 5):

5' GGG ACG TCG GCC GGC CAT CAT CAA TAA TAT ACC TTA TTT TGG 3'

Basensequenz des Primers Ad5-LE-B2 (= SEQ ID No. 6):

5' TTG ACG TCG GCG CGC CTT AAT TAA CGC CAA CTT TGA CCC GGA ACG C 3'

Mittels der angehängten Schnittstellen für die Enzyme AatII und FseI am 5'-Ende, sowie PacI und AscI am 3'-Ende konnte dieses PCR-Produkt in pUCRE über AatII und AscI kloniert werden.

Dabei entstand das in Fig. 1 dargestellte Plasmid. Dieses Plasmid-Konstrukt erlaubt das Ausschneiden des Ad5-Anteils mittels des Enzyms FseI. Die entstandene lineare DNA enthält die gleichen Enden wie der lineare Adenovirus-Wildtyp, verlängert auf jeder Seite um eine Base Cytosin.

## Beispiel 5 – Einbau einer Expressionskassette in das Plasmid pAd5min

Die DNA für das Green Fluorescent Protein (GFP) wurde aus pEGFP-N1 (Clontech) über BamHI- und XbaI-Schnittstellen in pABS.4 (Microbix) kloniert. Der Promotor und das polyA-Signal wurden aus pRc/CMV (Invitrogen) über die Schnittstellen ApoI/EcoRI und KpnI bzw. XbaI und XhoI/SalI in das obige Konstrukt kloniert. Das Plasmid wurde pAGFP/CB genannt. GFP samt Expressionskassette und Kanamycin-Resistenz konnten aus diesem Plasmid mittels der PacI-Schnittstellen isoliert und in pAd5min kloniert werden. Anschließend konnte die Resistenz über SmaI-Schnittstellen aus dem Plasmid entfernt werden. Dieses Plasmidkonstrukt wurde pGAd5min genannt. Aufgrund des seltenen Vorkommens der PacI-Schnittstelle kann das GFP-Gen zu späteren Zeitpunkten und nach Klonierung anderer Gene immer aus dem Plasmid herausgeschnitten werden.

1. Adenoviraler Transfervektor für den Gentransport einer DNA-Sequenz, **dadurch gekennzeichnet**, dass er aus einem adenoviralen Plasmid hergestellt ist, das keine natürlichen adenoviralen Proteine mehr exprimiert und
  - a) eine erste DNA-Sequenz mit der linken terminalen invertierten Sequenzwiederholung (ITR) und einem Verpackungssignal des Wildtyp Adenovirus (Serotyp 5),
  - b) eine zweite DNA-Sequenz mit der rechten terminalen invertierten Sequenzwiederholung (ITR) des Wildtyp Adenovirus (Serotyp 5) sowie
  - c) Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthält, die in den zwischen den adenoviralen DNA-Sequenzen einzubauenden Markergenen und/oder therapeutischen Genen nicht vorkommen und
  - d) die ITRs von Schnittstellen der Restriktionsendonuklease FseI eingeschlossen sind, wodurch ein Ausschneiden des adenoviralen Anteiles des Transfervektors möglich ist.
2. Transfervektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die erste DNA-Sequenz die Basenpaare 1 bis mindestens 358 und die zweite DNA die Basenpaare 35705–35935, wenigstens jedoch die Basenpaare 35833 bis 35935 des Wildtyp Adenovirus (Serotyp 5) aufweist.
3. Transfervektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass er jeweils eine Schnittstelle für die Restriktionsendonukleasen ClaI und/oder AscI enthält, wodurch das wiederholte Aneinanderreihen gleicher oder verschiedener cDNA-Sequenzen an der gleichen Schnittstelle möglich ist.
4. Transfervektor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass er eine Expressionskassette mit der kompletten oder einer verkürzten, für die Aminosäuren 1–852 und 1524–2332 codierenden cDNA-Sequenz des humanen Faktors VIII und gegebenenfalls weitere Expressionskassetten mit immunmodulierenden und/oder DNA-stabilisierenden Genen enthält.
5. Transfervektor nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass er zusätzlich ein oder mehrere Markergene enthält, die zur Entfernung aus dem Vektor von geeigneten Schnittstellen umgeben sind.
6. Transfervektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass er mit Hilfe eines adenoviralen Helfervirus oder Helferplasmids und einer Helferzelllinie konstruiert worden ist.
7. Verwendung eines Transfervektors nach den Ansprüchen 1 bis 6 zur Herstellung eines für die somatische Gentherapie einsetzbaren Arzneimittels.

---

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

---

- Leerseite -



Fig.1

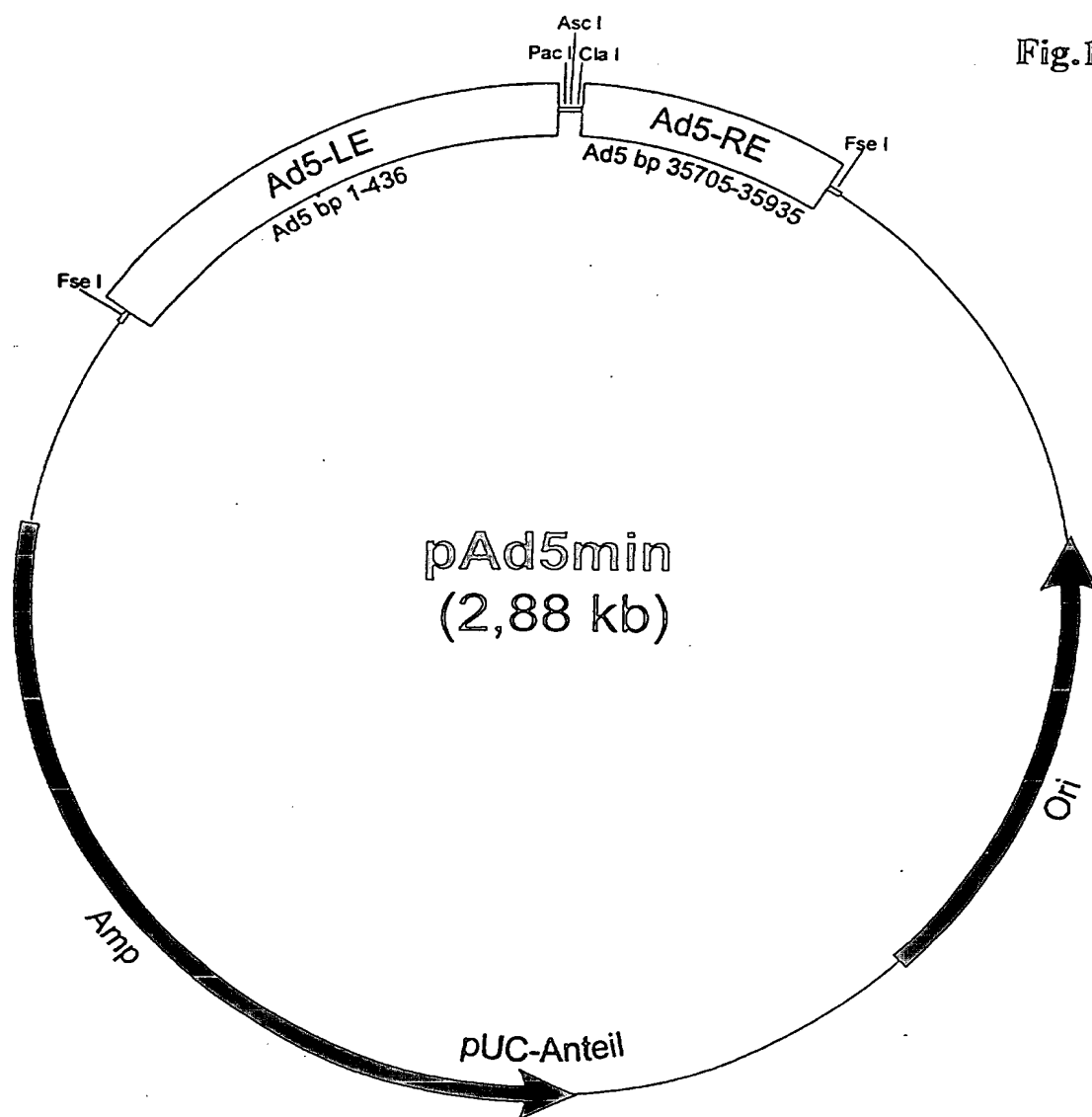
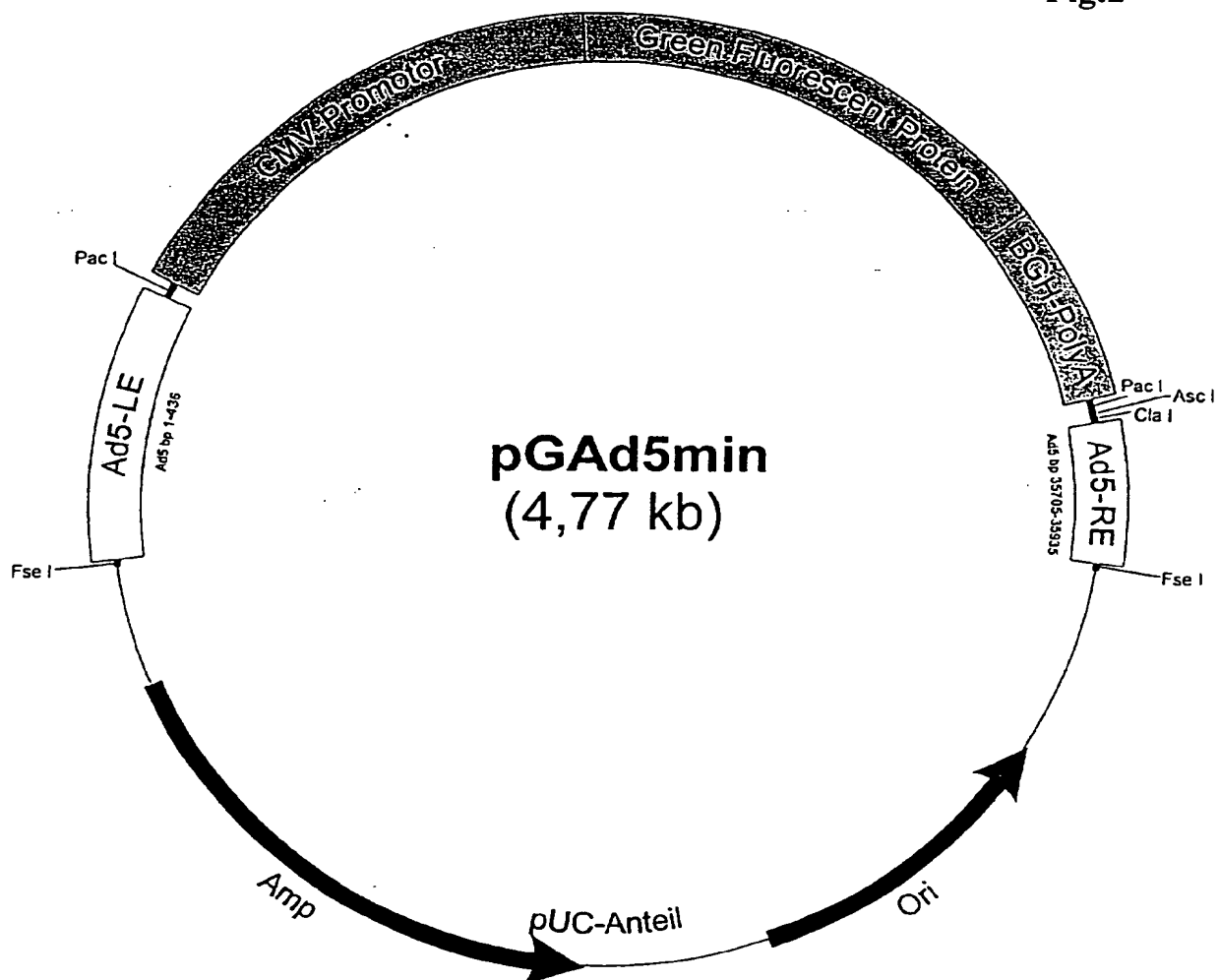


Fig.2



## Sequenzprotokoll

### Allgemeine Angaben

Anmelder: Centeon Pharma GmbH  
Emil-von-Behring-Straße 76  
35041 Marburg  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: 06421-39-2069  
Fax : 06421-39-4558

Bezeichnung der Erfindung: B-Domänen-verkürzte Faktor  
VIII-cDNA und ein diese cDNA  
enthaltender Transfervektor  
zum Einsatz in der Gentherapie

Anzahl der Sequenzen: 2

Zustellanschrift: Centeon Pharma GmbH  
P.O.Box 1230  
D-35002 Marburg  
Bundesrepublik Deutschland

Computerlesbare Fassung:

|                   |   |                   |
|-------------------|---|-------------------|
| Datenträger       | : | Diskette          |
| Computer          | : | IBM PC compatible |
| Operating System: |   | PC-DOS/MS-DOS     |
| Software          | : | WordPerfect 6.0   |

## Angaben zur SEQ ID NO. 1:

|            |   |                    |
|------------|---|--------------------|
| Länge      | : | 11 Basenpaare      |
| Art        | : | Oligonucleotid     |
| Strangform | : | Einzelstrang       |
| Topologie  | : | linear             |
| Herkunft   | : | Chemische Synthese |
| Merkmal    | : | Linker             |

## Sequenzbeschreibung:

5' G TCA GGC CTC C 3'

## Angaben zur SEQ ID NO. 2:

|            |   |                    |
|------------|---|--------------------|
| Länge      | : | 11 Basenpaare      |
| Art        | : | Oligonucleotid     |
| Strangform | : | Einzelstrang       |
| Topologie  | : | linear             |
| Herkunft   | : | Chemische Synthese |
| Merkmal    | : | Linker             |

## Sequenzbeschreibung:

5' AG GAG GCC TGA 3'

## Angaben zur SEQ ID NO. 3:

|            |   |                    |
|------------|---|--------------------|
| Länge      | : | 42 Basenpaare      |
| Art        | : | Oligonucleotid     |
| Strangform | : | Einzelstrang       |
| Topologie  | : | linear             |
| Herkunft   | : | Chemische Synthese |
| Merkmal    | : | Primer             |

## Sequenzbeschreibung:

5' TTG GCG CGC CAT CGA TGC CCA GAA ACG AAA GCC AAA AAA CCC 3'

## Angaben zur SEQ ID NO. 4:

|            |   |                    |
|------------|---|--------------------|
| Länge      | : | 43 Basenpaare      |
| Art        | : | Oligonucleotid     |
| Strangform | : | Einzelstrang       |
| Topologie  | : | linear             |
| Herkunft   | : | Chemische Synthese |
| Merkmal    | : | Primer             |

## Sequenzbeschreibung:

5' CCC AAG CTT GGC CGG CCA TCA TCA ATA ATA TAC CTT ATT TTG G 3'

## Angaben zur SEQ ID NO. 5:

|            |   |                    |
|------------|---|--------------------|
| Länge      | : | 42 Basenpaare      |
| Art        | : | Oligonucleotid     |
| Strangform | : | Einzelstrang       |
| Topologie  | : | linear             |
| Herkunft   | : | Chemische Synthese |
| Merkmal    | : | Primer             |

## Sequenzbeschreibung:

5' GGG ACG TCG GCC GGC CAT CAT CAA TAA TAT ACC TTA TTT TGG 3'

## Angaben zur SEQ ID NO. 6:

|       |   |                |
|-------|---|----------------|
| Länge | : | 46 Basenpaare  |
| Art   | : | Oligonucleotid |

|            |   |                    |
|------------|---|--------------------|
| Strangform | : | Einzelstrang       |
| Topologie  | : | linear             |
| Herkunft   | : | Chemische Synthese |
| Merkmal    | : | Primer             |

**Sequenzbeschreibung:**

5' TTG ACG TCG GCG CGC CTT AAT TAA CGC CAA CTT TGA CCC GGA ACG C 3'